

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 16 日 (16.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/085111 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/11, 1/19,
C12P 7/62 // (C12N 1/19, C12R 1:72)

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04426

(22) 国際出願日: 2003 年 4 月 8 日 (08.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-105240 2002 年 4 月 8 日 (08.04.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長岡 哲也
(NAGAOKA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒651-2124 兵庫県 神戸市 西区伊川谷町潤和 8 7 3-2 Hyogo (JP). 横溝 聡
(YOKOMIZO, Satoru) [JP/JP]; 〒674-0092 兵庫県 明石市 二見町東二見 1 6 3 0 シーハイツ 2 0 1 号
Hyogo (JP). 宮本 憲二 (MIYAMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒223-0062 神奈川県 横浜市 港北区日吉本町 2 丁目
3-1 3 日管ハイム第 8 1 0 1 Kanagawa (JP). 小坂田 史雄 (OSAKADA, Fumio) [JP/JP]; 〒700-0063 岡山県 岡山市 大安寺東町 1 7-7 Okayama (JP). 松本 圭司 (MATSUMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒663-8023 兵庫県 西宮市 大森町 1 1-3 3 Hyogo (JP). 高木 正道 (TAKAGI, Masamichi) [JP/JP]; 〒183-0051 東京都 府中市 栄町 1 丁目 3 1-1 0 Tokyo (JP). 太田 明德
(OTA, Akinori) [JP/JP]; 〒331-0063 埼玉県 さいたま市
プラザ 5 7-2 Saitama (JP).(74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番
2 0 号 中央ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROMOTERS

(54) 発明の名称: 新規プロモーター

(57) Abstract: It is intended to provide an ACT1 gene promoter represented by SEQ ID NO:9, a GAP3 gene promoter represented by SEQ ID NO:10, a PMA1 gene promoter represented by SEQ ID NO:11, and a TEF1 gene promoter represented by SEQ ID NO:12; a plasmid containing a gene expression unit containing such a promoter; transformed cells having the plasmid transferred thereinto; and a process for producing a copolymerized polyester by culturing the transformed cells.

(57) 要約: 配列番号 9 で示される ACT1 遺伝子プロモーター、配列番号 10 で示される GAP3 遺伝子プロモーター、配列番号 11 で示される PMA1 遺伝子プロモーター、及び、配列番号 12 で示される TEF1 遺伝子プロモーター; 当該プロモーターを含む遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド; 当該プラスミドを導入した形質転換細胞; 並びに、当該形質転換細胞を培養することからなる、共重合ポリエステル生産方法を提供する。

WO 03/085111 A1

明細書

新規プロモーター

技術分野

- 5 本発明は、キャンディダ属酵母において遺伝子発現を可能にするプロモーターに関する。詳しくは、キャンディダ属酵母において、培養条件や培地条件等の誘導条件に依存することなく構成的且つ高効率に有用遺伝子を発現できるプロモーターに関する。

10 背景技術

- 遺伝子組換え技術の発展に伴い、微生物を用いて有用蛋白質並びに有用化学品等の生産が行われてきた。原核生物である大腸菌や枯草菌を用いた遺伝子組換え系の開発が積極的に進められ、その中でも、特に大腸菌の宿主・ベクター系を用いて様々な有用物質の生産が行われている。しかし、大腸菌において生産される
- 15 蛋白質は菌体内で不溶性顆粒を形成することがあり、また、真核生物において特徴的な糖鎖付加を行うことができないなどの問題もあった。

- これに対して真核生物である酵母を宿主とした系の開発も進められた。酵母は古くから醸造や製パンに利用されており、またかつて飼料用として生産された経験もあり、高い安全性が保証されている。また、生産される蛋白質に糖鎖付加を
- 20 行うことも原核生物とは区別される特徴である。

- 遺伝学的知見が豊富なサッカロマイセス・セレビジェの他、シワニオマイセス属、クルイベロマイセス属、ピキア属、ハンセヌラ属、ヤロウィア属、キャンディダ属において、宿主・ベクター系が開発されている (Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Klaus W
- 25 olf 著, Springer 出版)。

これらの酵母の中には、直鎖炭化水素鎖 (n-アルカン) が唯一の炭素源であっても生育できるものがある。キャンディダ属のキャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) などや、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansen*

ula polymorpha)、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) などである。これらの酵母はn-アルカンの末端を酸化する酵素系をもち、酸化によって生じた長鎖カルボン酸を、ペルオキシソームの β 酸化系によってTCAサイクルの基質となるアセチル-CoAにまで分解し、エネルギー源として利用することができる。

n-アルカン資化性酵母は直鎖炭化水素を炭素源として生育するばかりでなく、通常の酵母の生育を阻害する疎水性物質に耐性であり、疎水性化学物質の変換による有用物質の生産・反応の場を提供する宿主としても有望である。したがって、このような酵母における遺伝子発現系を構築することによって、有害な副産物を生み出さず、エネルギーを浪費しない、新たな有用化学物質生産系を構築することができる。

n-アルカン資化性酵母のうちキャンディダ・マルトーサにおいて、遺伝子発現系の構築が積極的に行われてきた。M. Kawamuraらはキャンディダ・マルトーサより高効率形質転換の原因領域 (Transformation ability: 以下TRAと略す) を見出した (M. Kawamura, et al., Gene, vol. 24, 157, (1983))。この領域にはキャンディダ・マルトーサにおいて自律的複製に関わる配列 (Autonomously replicating sequence: 以下ARSと略す) およびセントロメア配列 (以下CENと略す) が含まれていることが判った。現在までにTRA全領域を有する低コピー数ベクターと、導入遺伝子高発現が期待できるCEN領域を除いた高コピー数ベクターが開発されている (M. Ohkuma, et al., Mol. Gen. Genet., vol. 249, 447, (1995))。

キャンディダ・マルトーサにおける遺伝子発現のためには同酵母内で機能するプロモーターが必要であり、複数のプロモーターが利用可能になっている。キャンディダ・マルトーサはn-アルカン酸化系の酵素をアルカンの存在下に高生産する。特にアルカンの初発酸化を行うチトクロームP450をコードする遺伝子の転写 (以下ALKと略す) は強く誘導され (M. Ohkuma, et al., DNA and Cell Biology, vol. 14, 163, (19

95))、また β 酸化系の酵素をコードする遺伝子の転写も誘導される (Y. Masuda, et al., Gene, vol. 167, 157, (1995))。ALK遺伝子群のうちALK1遺伝子のプロモーターは、*n*-アルカンによって遺伝子発現を最も強く誘導し、遺伝子発現に利用することができる。また、

5 脂肪酸存在下ではALK2やALK5遺伝子のプロモーターが適している。

解糖系の酵素として知られているホスホグリセリン酸キナーゼ (以下PGKと略す) のプロモーターは、グルコースの存在下で強力な遺伝子発現を誘導することが知られている。キャンディダ・マルトーサのPGKプロモーターがY. Masuda等によってクローニングされた (Y. Masuda, et al., Curr. Genet., vol. 25, 412, (1994))。更に、ガラクトース存在下において強力な遺伝子発現誘導活性を有するGALプロモーターもクローニングされた (S. M. Park, et al., Yeast, vol. 13, 21 (1997))。このようにしてクローニングされたALKプロモーター、PGKプロモーターやGALプロモーターはキャンディダ・マルトーサに
10 おける遺伝子発現に利用することができる。

しかしながら、ALKプロモーターはブドウ糖等の炭素源を利用する場合にはほとんど機能せず、またPGKプロモーターは脂肪酸や*n*-アルカンを炭素源とした場合にほとんど機能しない。このためキャンディダ・マルトーサにおける有用物質の生産において、当該物質の生産に適した炭素源が必ずしも強力な遺伝子
20 発現に適しているとはいえない。更にGALプロモーターはガラクトースを炭素源としたときにのみ誘導されることから、高価なガラクトースを利用しなければならない点で工業生産には適さないといえる。

そこで、キャンディダ・マルトーサにおいて高効率な有用物質の生産のためには、炭素源の種類による制限を受けず、強力に遺伝子発現できる新規プロモーターが望まれていた。
25

一方、サッカロマイセス・セレビジェではアルコールデヒドロゲナーゼ1遺伝子、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ3遺伝子 (以下GAP3と略す)、PGK、GALのプロモーターなどが既にクローニングされ、異種遺伝子発現用のプロモーターとして広く利用されており、同酵母を宿主とした場合

にこれらのプロモーター活性が強力であることが判っている。そこで、キャンディダ・マルトーサを宿主とした場合でも高発現が期待できるが、キャンディダ・マルトーサのこれらのプロモーター領域遺伝子は未だクローニングされておらず、クローニングが待たれていた。

- 5 しかしながら、キャンディダ属酵母は、サッカロマイセス・セレビジェとは異なり有性世代が知られておらず、多くは2倍体ゲノムを有している。また、その遺伝暗号読みとりにも異常があることも報告されている。キャンディダ・シリンドラッセ (*Candida cylindraceae*) (Y. Kawaguchi, et al., *Nature*, vol. 341, 164 (1989)) やキャンディダ・マルトーサ (H. Sugiyama, et al., *Yeast*, vol. 11, 43 (1995)) は通常ロイシンをコードするCUGコドン
- 10 をセリンとして読むことが報告されている。このように、キャンディダ属酵母はサッカロマイセス・セレビジェとは大きく異なる性質を有しているといえるため、サッカロマイセス・セレビジェ由来のプロモーター領域がそのままキャンディダ
- 15 属酵母内で同等のプロモーター活性を有するかどうかは不明であった。

発明の要約

- 本発明は、上記現状に鑑み、キャンディダ属酵母、特にキャンディダ・マルトーサにおいて炭素源の種類によって影響を受けることなく、構成的且つ高効率に
- 20 有用物質の生産を行うことができる新規プロモーターを提供するものである。

- 本発明者等は鋭意研究を行った結果、キャンディダ・マルトーサのアクチン合成酵素1遺伝子 (以下ACT1と略す) プロモーター、グリセルアルデヒド3ーリン酸デヒドロゲナーゼ3遺伝子 (以下GAP3と略す) プロモーター、原形質膜プロトンATPase1遺伝子 (以下PMA1と略す) プロモーター、翻訳
- 25 伸長因子1遺伝子 (以下TEF1と略す) プロモーターの配列を初めて同定し、それらプロモーターが、従来のALKプロモーター、PGKプロモーター、GALプロモーターと、同等或いはそれ以上のプロモーター活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下の(a)～(d)いずれかのDNAからなるACT1

遺伝子プロモーターである。

(a) 配列番号 9 で示される DNA。

(b) 配列番号 9 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

5 (c) 配列番号 9 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(d) 配列番号 9 で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来の DNA。

また本発明は、以下の (a) ~ (d) いずれかの DNA からなる GAP 3 遺伝子プロモーターでもある。

(a) 配列番号 10 で示される DNA。

(b) 配列番号 10 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

15 (c) 配列番号 10 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(d) 配列番号 10 で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来の DNA。

さらに本発明は、以下の (a) ~ (d) いずれかの DNA からなる PMA 1 遺伝子プロモーターでもある。

20 (a) 配列番号 11 で示される DNA。

(b) 配列番号 11 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(c) 配列番号 11 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

25 (d) 配列番号 11 で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来の DNA。

さらに本発明は、以下の (a) ~ (d) いずれかの DNA からなる TEF 1 遺伝子プロモーターでもある。

(a) 配列番号 12 で示される DNA。

(b) 配列番号 1 2 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(c) 配列番号 1 2 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

5 (d) 配列番号 1 2 で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来の DNA。

また本発明は、上記いずれかのプロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなる DNA でもある。

10 また本発明は、上記 DNA とターミネーターからなる遺伝子発現ユニットでもある。

また本発明は、上記遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミドでもある。

また本発明は、宿主細胞に、上記 DNA 又は上記プラスミドを導入した形質転換細胞でもある。

15 また本発明は、構造遺伝子が、3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサノ酸の共重合ポリエステルの合成に関与する酵素をコードする、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である上記形質転換細胞を培養することからなる、3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサノ酸の共重合ポリエステルの生産方法でもある。

20 発明の詳細な開示

キャンディダ・マルトーサ由来の ACT 1 遺伝子プロモーター、GAP 3 遺伝子プロモーター、PMA 1 遺伝子プロモーター、そして TEF 1 遺伝子プロモーターは、本発明において初めてその配列が同定された、新規なプロモーターである。以下、その詳細について説明する。

25 (1) 新規プロモーターのクローニング

ACT 1 遺伝子は細胞骨格を構成するアクチンの合成に関与する酵素の一種、GAP 3 遺伝子は解糖系酵素の一種、PMA 1 遺伝子はサッカロマイセス属の酵母においては原形質膜蛋白の約 10% を占めると言われる原形質膜蛋白の一種、TEF 1 遺伝子は蛋白質合成における翻訳伸長因子の 1 種であり、いずれのプロ

モーターもサッカロマイセス・セレビジェでは強力なプロモーターとして知られている。

本発明においてキャンディダ・マルトーサのACT1遺伝子、GAP3遺伝子、PMA1遺伝子およびTEF1遺伝子のプロモーター領域をハイブリダイゼーション法によりクローニングするため、まず比較的近縁の属であるサッカロマイセス・セレビジェよりそれぞれ対応する構造遺伝子の部分DNA配列をPCR法で増幅し、プローブ断片として用いた。例えばサッカロマイセス・セレビジェのACT1遺伝子配列は既に報告されている (Daniel. H. M. et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol. 51, 1593 (2001))。その配列からサッカロマイセス・セレビジェのACT1遺伝子増幅用PCRプライマーが合成できる。サッカロマイセス・セレビジェのGAP3構造遺伝子配列は、既に報告されている (Holland, M. J. et al., J. Biol. Chem. vol. 254, 5466 (1979))。その配列からサッカロマイセス・セレビジェのGAP3遺伝子増幅用PCRプライマーが合成できる。またサッカロマイセス・セレビジェのPMA1遺伝子配列はCapiiaux, E., et al., J. Biol. Chem. vol. 264, 7437 (1989)により既に報告されている。その配列からサッカロマイセス・セレビジェのPMA1構造遺伝子増幅用PCRプライマーが合成できる。サッカロマイセス・セレビジェのTEF1構造遺伝子配列はCottrell, P., et al., J. Biol. Chem. vol. 260, 3090 (1985)により既に報告されている。その配列からサッカロマイセス・セレビジェのTEF1構造遺伝子増幅用PCRプライマーが合成できる。

サッカロマイセス・セレビジェ及びキャンディダ・マルトーサの染色体DNAは市販の試薬等を用いて分離できる。分離したサッカロマイセス・セレビジェの染色体DNAをPCRの鋳型とし、上記の合成したプライマーを用いてPCRを行うことにより、それぞれのプライマーに対応してサッカロマイセス・セレビジェのACT1、GAP3、PMA1又はTEF1構造遺伝子の一部分を増幅することが可能である。増幅したDNA断片を放射性化合物或いはアルカリフォスファターゼなどで標識する事により、ハイブリダイゼーションの検出プローブとす

る事ができる。

キャンディダ・マルトーサの染色体DNAを分離し、適当な制限酵素で断片化し、アガロースゲル電気泳動後、上記検出プローブとサザン・ハイブリダイゼーションを行って、それぞれ目的とするプロモーター配列を含むと考えられる断片の長さを推定できる。各プロモーター毎に前記サザン・ハイブリダイゼーションに使用した制限酵素でキャンディダ・マルトーサの染色体を切断処理し、クローニングベクターを用いて遺伝子ライブラリーを作製できる。このライブラリーを抗生物質を含む寒天培地上に適当数コロニーが出現するように形質転換した後、ニトロセルロース膜上で培養し、この膜をアルカリ変性、次に中和、続いて洗浄、乾燥した後、ハイブリダイゼーションを行うことによりキャンディダ・マルトーサのそれぞれのプロモーターを含む染色体DNA断片をクローニングする事が可能である。ここで得られるDNA断片はプロモーター領域だけでなく構造遺伝子も含んでいる。そこで、サッカロマイセス・セレビジェなどの塩基配列が既知の対応するプロモーターや構造遺伝子との塩基配列の類似性（相同性）から判断し、一般的な手法を用いて、プロモーター領域の同定や構造遺伝子との分離を行い、プロモーターの塩基配列を決定することができる。

以上の手法により、本発明の新規なACT1遺伝子プロモーター、GAP3遺伝子プロモーター、PMA1遺伝子プロモーターおよびTEF1遺伝子プロモーターを得ることができる。これらプロモーターの塩基配列を、それぞれ、配列番号9、10、11、12に示す。

本発明の上記プロモーターは、上述した手法を用いて得ても良いし、塩基配列が同定されたことから、化学的に合成して得ることも可能である。

本発明のプロモーターは、上記配列番号9、10、11または12で示されるDNAだけでなく、プロモーター活性を有する限り、上記配列番号で示される塩基配列を含むDNAであってもよいし、上記配列番号で示される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含むDNAであってもよいし、上記配列番号で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、キャンディダ属酵母由来のDNAであってもよい。

上記配列番号で示される塩基配列を含むDNA、及び、上記配列番号で示され

る塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含むDNAとは、蛋白核酸酵素 増刊 遺伝子増幅PCR法 TAKKA J 35 (17), 2951-3178 (1990) 又はHenry A. Erlich編 加藤郁之進監訳 PCRテクノロジー (1990) などに記載の当業者5 業者に周知の方法により欠失、追加、挿入及び／又は置換できる程度の数の塩基が欠失、追加、挿入及び／又は置換されてなる塩基配列からなるDNAのことをいう。

上記配列番号で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、上記配列番号に示す塩基配列からなるDNAをプローブとして、10 て、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、又はサザン・ハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるDNAのことをいう。

本発明のDNAは、上記配列番号で示される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列からなるものが好ましい。相同性は90%以上が好ましく、95%15 %以上がより好ましく、98%以上がさらに好ましい。

「相同性」は、対比する2つの塩基配列を最適に整列させた後、塩基(A, T, C, G, U又はI)が両方の配列で適合した位置の数を適合位置数とし、これを比較塩基総数で除して、そして、この結果に100を乗ずることにより算出する。具体的には、日立ソフトエンジニアリング製のDNASIS、ソフトウェア開発20 のGENETYX、又は、Finland CSCのClustal Xといった解析ソフトを用いて算出することができる。

これらDNAは、上述した当業者に周知の方法により上記配列番号で示されるDNAに対して少なくとも1つの塩基の欠失、追加、挿入及び／又は置換を行うことにより、また、Molecular Cloning 2nd Edt. (25 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されている方法に準じてハイブリダイゼーションを実施したりすることで容易に取得することができる。

本発明において「プロモーター活性を有する」プロモーターとは、後述するプロモーターの機能解析によって測定した酵素活性が、上記配列番号で示されるD

NAについて同条件下で測定された酵素活性に対して、50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の酵素活性を示すプロモーターのことをいう。

(2) プロモーター機能の解析

- 5 新規プロモーターの機能解析は、同プロモーターによって転写されるmRNAや同mRNAから翻訳される遺伝子産物を定量することによって行うことができる。

本発明のプロモーターは、その下流に構造遺伝子を連結させることで、該構造遺伝子の機能を発現させることができる。本発明で用いられる構造遺伝子として
10 は特に限定されないが、例えば、ポリヒドロキシアルカノエート（特に、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサノ酸との共重合ポリエステルP（3HB-co-3HH））の合成に関与する酵素をコードする遺伝子、抗体遺伝子、リンホカイン等の有用蛋白質をコードする遺伝子等が挙げられる。

さらに、必要であれば、本発明のプロモーター、およびその下流に連結された
15 構造遺伝子に、ターミネーターを加えた遺伝子発現ユニットとして用いることができる。ここで、用いられるターミネーターとしては、目的とする発現系で使用するものであれば、適宜公知のターミネーターを使用することができる。上記ターミネーターとしては特に限定されないが、ALK1、GCN4等が挙げられる。

20 また、前記遺伝子発現ユニットをプラスミドに組み込んで利用することもできる。本発明において用いられるプラスミドとしては特に限定されないが、pUTU1, pBTH10B (Nakazawa, et al., J. Bacteriol., vol. 179, 5030 (1997)) 等が挙げられる。

本発明において、上記プラスミドを、発現系となる宿主細胞に導入して形質転
25 換細胞を作製し、これら形質転換細胞を培養して、導入した構造遺伝子を発現させることができる。また、プラスミドを導入するのではなく、本発明のプロモーターとその下流に連結された構造遺伝子からなるDNAを、直接宿主の染色体に組み込んでもかまわない。ここで用いられる宿主としては、本発明のプロモーターが機能するものであれば特に限定されないが、キャンディダ属酵母が好ましく、

特にキャンディダ・マルトーサが好ましい。

本発明のプラスミドの宿主細胞への形質転換は、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法 (E. M. Lederberg, et al., J. Bacteriol., vol. 119, 1072 (1974)) や、エレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻、1. 8. 4項、1994年) 等を用いることができる。また、Fast Track™-Yeast Transformation Kit SM (Geno Technology) のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

- 10 得られた形質転換体を用いての新規プロモーターの機能解析は、同形質転換体が資化できる炭素源を用いて培養して行うことができる。培養には、YPD培地 (酵母エキス1%、ポリペプトン2%) やYNB培地 (Yeast nitrogen base 0.67%) 等に炭素源を加えた、一般的に形質転換体の培養に用いられる培地が利用できる。また、完全合成培地なども利用可能である。
- 15 本発明で用いられる炭素源としては特に限定されないが、例えば、グルコース、マルトース等の糖類；n-アルカン、脂肪酸、油脂等が利用できる。培養温度、培養時間は形質転換体が好適に増殖可能であれば特に限定されるものではないが、好ましくは10℃～40℃で2時間～72時間培養を行うことができる。培養の終了した菌体は、培養液又は菌体内蛋白質を解析することによりプロモーターの
- 20 機能解析を行うことができる。プロモーターの下流に接続した遺伝子から発現する酵素などが菌体外に発現する場合は菌体を破碎する必要はないが、菌体内に留まる場合は菌体処理が必要となる。菌体処理を行う方法は特に限定されるものではないが、菌体をZymolyase等の細胞壁溶解酵素により消化した後に超音波処理や凍結融解法等を用いることができる。また、ガラスビーズを用いて直
- 25 接物理的破碎を行うこともできる。

プロモーターの機能解析は、プロモーターの下流に接続する遺伝子から発現する酵素等の活性や量を特異的に検出できる方法を用いて行うことができる。特に限定されることはないが、例えば、(1) でクローニングしたそれぞれのプロモーター領域を用いて、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸との共重

合ポリエステルP (3HB-co-3HH) の合成に関与する酵素をコードする、
アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子 (以下ORF 2 Sと略す) 発現ベクターを構築し、その酵素活性を以下の文献の方法により測定して行うことができる (Valentin, H. E., et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 40, 699, (1994))。具体的には、ORF 2 Sを用いてプロモーターの活性を測定する場合は、(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoAがORF 2 Sにより取り込まれる際に遊離するCoA-SHを、CoA-SHと等モルで反応するDTNB (5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)) と反応させ、この時遊離
10 CoA-SHと等モルで生ずるイオン化TNB (2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸) に由来する412nm付近の吸光度の単位時間当たりの増加を測定することで、簡便に酵素活性を測定することができる。

得られた酵素活性の値は、酵素活性測定に用いた菌体破碎溶液の蛋白質量を用いて標準化することで、本発明によるプロモーターにより発現する酵素比活性として表記することができ、プロモーター活性として相互に比較することができる。
15

本発明のプロモーターのうち、ACT 1 遺伝子プロモーター、PMA 1 遺伝子プロモーターおよびTEF 1 遺伝子プロモーターは、いずれも生育に不可欠な遺伝子のプロモーターであり、従って、炭素源の種類に制限されず、キャンディダ・マルトーサが生育しうる条件であれば、機能しうるプロモーターである。また
20 GAP 3 遺伝子プロモーターは解糖系の酵素のプロモーターであり、特に炭素源としてグルコースを用いた場合に非常に強力な発現が期待できるという点で従来のプロモーターにない性質を有している。

本発明の生産方法においては、構造遺伝子が、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合ポリエステルの合成に関与する酵素をコードする、ア
25 エロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である上記形質転換細胞を培養することにより、上記共重合ポリエステルを生産することができる。

この際の培養に用いる炭素源としては、形質転換体が資化できるものであればどのようなものでもよい。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その

他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃～40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

- 5 炭素源としては、グルコース、グリセリン、シュクロース等の炭水化物、油脂類、脂肪酸類、さらにはn-パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えば、ナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。脂肪酸としては、例えば、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸等の飽和・不飽和
- 10 脂肪酸、あるいは、これら脂肪酸のエステルや塩等の脂肪酸誘導体が挙げられる。一例として、キャンディダ・マルトーサの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない形質転換体では、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を
- 15 付与することもできる。

- 窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げら
- 20 れる。

その他の有機栄養源としては、例えば、アミノ酸類（例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン等）、ビタミン類（例えばビタミンB1、ビタミンB12、ビオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等）等が挙げられる。

- 25 本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は、例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノール

やヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。

5 図面の簡単な説明

図1は、実施例9のプラスミド構築に用いたプラスミドpUAL-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

図2は、実施例9～13のプラスミド構築に用いたプラスミドpSTV-ALK1-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

10 図3は、実施例9～13のプラスミド構築に用いたプラスミドpUTA1の制限酵素地図を示してある。

図4は、実施例9で構築したプラスミドpUTA-ALK1-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

15 図5は、実施例10で構築した、本発明の一態様であるプラスミドpUTA-ACT1-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

図6は、実施例11で構築した、本発明の一態様であるプラスミドpUTA-GAP3-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

図7は、実施例12で構築した、本発明の一態様であるプラスミドpUTA-PMA1-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

20 図8は、実施例13で構築した、本発明の一態様であるプラスミドpUTA-TEF1-ORF2Sの制限酵素地図を示してある。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、
25 れら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

(実施例1) 酵母染色体DNAの調製

サッカロマイセス・セレビジエ及びキャンディダ・マルトーサの染色体DNAはE. Z. N. A. Yeast DNA Kits (OMEGA BIOTEK

社製)を用いて調製した。調製方法は、同Kitに付属する説明書に従った。

(実施例2) サッカロマイセス・セレビジェのACT1、GAP3、PMA1及びTEF1遺伝子断片の増幅

- 5 既に塩基配列が明らかにされているサッカロマイセス・セレビジェのACT1、GAP3、PMA1及びTEF1遺伝子断片の増幅は以下のように行った。実施例1で調製したサッカロマイセス・セレビジェ染色体DNAを鋳型として、ACT1用には配列番号1及び2、GAP3用には配列番号3及び4、PMA1用には配列番号5及び6、TEF1用には配列番号7及び8に示した合成DNAをプライマーとして、TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ(宝酒造製)を用いてPCRにより増幅させた。その条件は、同Kitに付属する説明書に従ったが、詳しくは、鋳型DNA1 μ g、それぞれ終濃度1 μ Mの2種類のプライマー、2.5UのEx Taq ポリメラーゼ、付属するBufferを0.01ml、付属するdNTP混合液を0.008mlに水を加えて0.1mlとした。これを、98℃15秒、55℃1分、72℃1分を1サイクルとして25サイクルのPCRを行って、サッカロマイセス・セレビジェの約400bpのACT1遺伝子断片、或いは約1kbのGAP3遺伝子断片、或いは約2.8kbのPMA1遺伝子断片、或いは約1.5kbのTEF1遺伝子断片を増幅させた。
- 10
- 15

- 20 (実施例3) 標識プローブ断片の調製、ハイブリダイゼーション、洗浄、陽性クローンの検出

増幅させたそれぞれのプローブ断片は、アマーシャムファルマシア社製Gene images AlkPhosキットを用い、付属する説明書に従ってアルカリフォスファターゼにより標識した。

- 25 ハイブリダイゼーションはアマーシャムファルマシア社製Gene images AlkPhosキットを用い、付属する説明書に従って55℃で一晩行った。

洗浄は、アマーシャムファルマシア社製Gene images AlkPhosキットを用い、付属する説明書に従って55℃及び室温で行った。

陽性クローンの検出は、アマーシャムファルマシア社製CDP-Starキットを用い、付属する説明書に従って行った。

(実施例4) キャンディダ・マルトーサACT1遺伝子プロモーター領域のクローニング

5 クローニング

実施例1で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体DNAを制限酵素Bgl
1 I Iで切断し、アガロースゲル電気泳動にて約1 kb～3 kbの断片をゲルから抽出した。この断片をpUC19を制限酵素BamHIで処理したものと連結し、大腸菌(E. coli) DH5 α 株に形質転換した。同形質転換株約300
10 0個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェACT1遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、6株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の部分塩基配列を決定したところ、キャンディダ・マルトーサのACT1プロモーター領域を含む遺伝子であった。クローニングした断片の一部配列を配列番号9に示した。

15

(実施例5) キャンディダ・マルトーサGAP3遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例1で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体DNAを制限酵素EcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動にて約7 kb～9 kbの断片をゲルから抽出した。この断片をpUC19を同制限酵素で処理したものと連結し、大腸
20 菌(E. coli) DH5 α 株に形質転換した。同形質転換株約2000個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェGAP3遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、2株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の部分塩基配列を決定したところ、キャンディダ・マルトーサのGAP3プロモーター領域を含む遺伝子であった。ク
25 ローニングした断片の一部配列を配列番号10に示した。

(実施例6) キャンディダ・マルトーサPMA1遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例 1 で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体 DNA を制限酵素 X b a I で切断し、アガロースゲル電気泳動にて約 2 k b ~ 4 k b の断片をゲルから抽出した。この断片を p U C 1 9 を同制限酵素で処理したものと連結し、大腸菌 (E. c o l i) D H 5 α 株に形質転換した。同形質転換株約 5 0 0 0 個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェ P M A 1 遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、5 株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の塩基配列を決定したところ、配列番号 1 1 に示すようにキャンディダ・マルトーサの P M A 1 プロモーター領域を含む遺伝子であった。

10

(実施例 7) キャンディダ・マルトーサ T E F 1 遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例 1 で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体 DNA を制限酵素 E c o R I 及び P s t I で切断し、アガロースゲル電気泳動にて約 2 k b ~ 4 k b の断片をゲルから抽出した。この断片を p U C 1 9 を同制限酵素で処理したものと連結し、大腸菌 (E. c o l i) D H 5 α 株に形質転換した。同形質転換株約 4 0 0 個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェ T E F 1 遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、7 株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の塩基配列を決定したところ、配列番号 1 2 に示すようにキャンディダ・マルトーサの T E F 1 プロモーター領域を含む遺伝子であった。

20

(実施例 8) ポリエステル合成に関与する遺伝子の合成

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャビエ由来のポリヒドロキシアルカノエート (P H A) 合成酵素 (T. F u k u i, e t a l F E M S M i c r o b i o l o g y L e t t e r s, v o l. 1 7 0, 6 9 (1 9 9 9)) のアミノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を合成した。キャンディダ・マルトーサは C T G コドンをロイシンではなくセリンに翻訳する酵母であるため、ロイシンコドンには C T G を割り当てなかった。各アミノ酸に対応

25

するコドンはキャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択した。コドンの使用頻度はKlaus Wolf著のNonconventional Yeast in Biotechnology (Springer出版)を参考にした。このようにしてPHA合成酵素遺伝子(以下ORF 2 Sと略す; 配列番号13)を設計し、ORF 2 S遺伝子部分を全合成した。

(実施例9) キャンディダ・マルトーサALK1プロモーターによるORF 2 S発現ベクターの構築

前記ORF 2 Sをキャンディダ・マルトーサで発現させるため、5' 上流にキャンディダ・マルトーサのAlk1遺伝子のプロモーターALK1p (配列番号15)を、また3' 下流にキャンディダ・マルトーサのAlk1遺伝子のターミネーターALK1t (配列番号14)を連結した。プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためにPCR法を利用した。プロモーター部分は配列番号15を鋳型にして配列番号16と配列番号17を用いて行い、5' 末端がPvuII、3' 末端がEcoRIのALK1p断片を作製した。ターミネーター部分は配列番号14を鋳型にして配列番号18と配列番号19を用いて行い、5' 末端がHindIII、3' 末端がEcoRVのALK1t断片を作製した。pUCNT (WO94/03613に記載)のPvuII、EcoRI部位にALK1p断片を連結し、またpUCNTのHindIII、SspI部位にALK1t断片を結合してpUAL1を構築した。次にpUAL1のNdeI、PstI部位にORF 2 S断片を結合し、プラスミドpUAL-ORF 2 S (図1)を構築した。次にこのプラスミドをSalIで部分分解し、XhoIリンカー (宝酒造社製)を用いてSalI部位をXhoI部位に変換した。一旦、PvuI及びPvuIIで切断し、pSTV28 (宝酒造社製)のPvuI及びSmaI断片と連結し、図2に示したpSTV-ALK1-ORF 2 Sを構築した。

更にpUTU1 (M. Ohkuma, et al, J. Biol. Chem., vol. 273, 3948 (1998))とキャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子 (Genebank D00855)を用いてマーカー遺伝子をウラシ

ルからアデニンに変更したベクターである p U T A 1 (図 3) を使用した。その構築は、p U T U 1 から X h o I を用いて U R A 3 遺伝子を除去し、これに S a l I を用いて切り出した A D E 1 遺伝子断片を接続して行った。

p S T V - A L K 1 - O R F 2 S から E c o T 2 2 I を用いてプロモーター及び O R F 2 S 及びターミネーターを含む断片を調製し、p U T A 1 の P s t I 部位に挿入して図 4 に示した p U T A - A L K 1 - O R F 2 S を構築した。

(実施例 10) キャンディダ・マルトーサ A C T 1 プロモーターによる O R F 2 S 発現ベクターの構築

10 実施例 4 でクローニングした キャンディダ・マルトーサ A C T 1 プロモーター領域を用いた O R F 2 S 発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号 20 及び 21 に示す合成 DNA をプライマーとし、キャンディダ・マルトーサ A C T 1 プロモーター領域を含む断片 (配列番号 9) を鋳型として P C R を行い、
5 ‘側末端が制限酵素 E c o T 2 2 I、3’ 側末端が制限酵素 N d e I となる断片を得、この断片を E c o T 2 2 I 及び N d e I で処理した。実施例 9 で得た p S T V - A L K 1 - O R F 2 S を同じく E c o T 2 2 I 及び N d e I で処理し、A L K プロモーターを除く断片を調製した。これら 2 個の断片を連結して、p S T V - A C T 1 - O R F 2 S を構築した。同プラスミドを制限酵素 E c o T 2 2 I で処理し、A C T 1 - O R F 2 S 断片を調製した。この断片を、実施例 9 で得
20 た p U T A 1 の P s t I 部位に挿入して図 5 に示した p U T A - A C T 1 - O R F 2 S 発現ベクターを構築した。

(実施例 11) キャンディダ・マルトーサ G A P 3 プロモーターによる O R F 2 S 発現ベクターの構築

25 実施例 5 でクローニングした キャンディダ・マルトーサ G A P 3 プロモーター領域を用いた O R F 2 S 発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号 22 及び 23 に示す合成 DNA をプライマーとし、キャンディダ・マルトーサ G A P 3 プロモーター領域を含む断片 (配列番号 10) を鋳型として P C R を行い、
5 ‘側末端が制限酵素 X h o I、3’ 側末端が制限酵素 N d e I となる断片を得、

この断片をXhoI及びNdeIで処理した。実施例9で得たpSTV-ALK1-ORF2Sプラスミドを同じくXhoI及びNdeIで処理し、ALKプロモーターを除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-GAP3-ORF2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素XhoI及びSalIで処理し、GAP3-ORF2S断片を調製した。実施例9で得たpUTA1プラスミドをSalIで処理し、これらを連結することによって図6に示したpUTA-GAP3-ORF2S発現ベクターを構築した。

10 (実施例12) キャンディダ・マルトーサPMA1プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

実施例6でクローニングしたキャンディダ・マルトーサPMA1プロモーター領域を用いたORF2S発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号24及び25に示す合成DNAをプライマーとし、キャンディダ・マルトーサPMA1プロモーター領域を含む断片（配列番号11）を鋳型としてPCRを行い、5'側末端が制限酵素XhoI、3'側末端が制限酵素NdeIとなる断片を得、この断片をXhoI及びNdeIで処理した。実施例9で得たpSTV-ALK1-ORF2Sプラスミドを同じくXhoI及びNdeIで処理し、ALKプロモーターを除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-PMA1-ORF2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素XhoI及びSalIで処理し、PMA1-ORF2S断片を調製した。実施例9で得たpUTA1プラスミドをSalIで処理し、これらを連結することによって図7に示したpUTA-PMA1-ORF2S発現ベクターを構築した。

25 (実施例13) キャンディダ・マルトーサTEF1プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

実施例7でクローニングしたキャンディダ・マルトーサTEF1プロモーター領域を用いたORF2S発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号26及び27に示す合成DNAをプライマーとし、キャンディダ・マルトーサTEF1プロモーター領域を含む断片（配列番号12）を鋳型としてPCRを行い、

5 ‘側末端が制限酵素XhoI、3’側末端が制限酵素NdeIとなる断片を得、この断片をXhoI及びNdeIで処理した。実施例9で得たpSTV-ALK1-ORF2Sプラスミドを同じくXhoI及びNdeIで処理し、ALKプロモーターを除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-TEF1-ORF2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素XhoI及びSalIで処理し、TEF1-ORF2S断片を調製した。実施例9で得たpUTA1プラスミドをSalIで処理し、これらを連結することによって図8に示したpUTA-TEF1-ORF2S発現ベクターを構築した。

10 (実施例14) キャンディダ・マルトーサの形質転換株の分離

キャンディダ・マルトーサ AC16株（ブダペスト条約に基づく寄託、国際寄託当局：独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番3号）、寄託日2000年11月15日、受託番号FERMBP-7366）への形質転換はエレクトロポレーション法にて行った。YPD
15 培地にて30℃で一晩前培養した培養液の1mlを同培地100mlの入った500ml容坂口フラスコに接種し、30℃にて約7時間培養した。3000rpmで室温、10min遠心した後、氷冷した1Mソルビトール溶液約50mlで3回洗浄した。3mlの同溶液に細胞を懸濁し、0.1mlずつ分注して-80℃にて保存し、形質転換用細胞とした。遺伝子導入にはECM600M（BTX
20 社製）を用いた。詳しくは同形質転換用細胞0.1mlに対し、実施例9～13で構築した発現ベクターDNAのいずれか約1μgをギャップが2mm幅のキューベットに入れ、モード2.5kv、電圧1.9kv、抵抗246Ωの条件で電気パルスをかけ直ちに氷冷後、0.5mlの1Mソルビトールを添加し室温に1時間保温した後、YNB選択プレート上で30℃にて培養した。選択プレートとし
25 ては、0.67w/v% Yeast Nitrogen Base without amino acid（Difco社製）、2w/v%グルコース、2w/v%Bacto Agar（Difco社製）を用いた。

以上によって、実施例9～13で構築した発現ベクターのいずれかを含む5種類の形質転換体を得た。

(実施例15) プロモーター機能の解析

実施例14で得られた形質転換株を0.67w/v% Yeast Nitro
 gen Base without amino acid (Difco社製)、
 5 2w/v%グルコースで一晩前培養した後、その2.5mlを同培地50mlの
 入った500ml容坂口フラスコに接種し、30℃にて24時間培養した。比較
 例としたALK1プロモーターによる発現ベクターの培養のみ、炭素源として2
 w/v%のn-ドデカンを用いた。そのうち約10ml相当の培養液を3000
 rpmで室温、10min遠心した後、生理食塩水で洗浄、同条件にて再度遠心
 10 した。この菌体を1mlの0.5Mリン酸カリウム溶液(pH7.2)に懸濁し、
 同量の酵母破碎用ガラスビーズ(0.45mm、Biospec Produc
 ts社製)と混合し、Mini BeadBeater(Biospec Pr
 oducts社製)で1minずつ5回処理して細胞を破碎し、卓上遠心器にて
 3000gで10秒間遠心して上清を分取してORF2S活性測定用サンプルと
 15 した。同サンプルを用いて、Protein Assay キット(Bio-R
 ad社製)による蛋白質濃度測定及びValentin, H. E., et al,
 Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 40, 69
 9, (1994)に示される酵素活性の測定を行った。

具体的には、水0.338mlに細胞破碎液0.01mlと7mg/mlの(
 20 R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA(シグマ社製)の水溶液0.01213
 ml及び0.5Mリン酸カリウム溶液(pH7.2)に溶解した3.8mg/ml
 のDTNB(シグマ社製)0.04mlを混合し、室温にて5分間412nm
 の吸光度の変化を測定した。吸光度の測定には、島津製作所製の分光光度計を用
 いた。活性は、以下に示す式により算出した。

$$25 \quad \text{活性 (U/ml)} = \Delta A_{412} / \text{分} \times 10^3 \times V_T / \epsilon_{412} \times V_E$$

上記式において、 $\Delta A_{412} / \text{分}$: 1分間当たりの吸光度の増加量、 V_T : 反応
 液量(ml)、 ϵ_{412} : $15.6 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ 、 V_E : 酵素液量(
 ml)である。

同酵素活性は、上記文献及び以下の式に示されるように比活性(U/mg)で

表示される。

$$\text{比活性 (U/mg)} = \text{活性 (U/ml)} / \text{蛋白質濃度 (mg/ml)}$$

その結果を表 1 に示した。この結果から本発明によりクローニングされた ACT 1、GAP 3、PMA 1、TEF 1 プロモーター領域がキャンディダ・マルト
5 ーサ細胞内で ALK 1 プロモーターと同等又はそれ以上の効率で機能するプロモーターであることが分かった。

表 1

プロモーター	酵素活性 (U/mg)
ACT 1	0.021
GAP 3	0.018
PMA 1	0.020
TEF 1	0.025
ALK 1	0.021

産業上の利用の可能性

本発明により、キャンディダ属酵母、特にキャンディダ・マルトーサにおいて
有用遺伝子の発現を高効率に行うことが可能となった。

請求の範囲

1. 以下の (a) ~ (d) いずれかの DNA からなる ACT 1 遺伝子プロモーター。

5 (a) 配列番号 9 で示される DNA。

(b) 配列番号 9 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(c) 配列番号 9 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

10 (d) 配列番号 9 で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来の DNA。

2. 請求の範囲第 1 項記載の ACT 1 遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなる DNA。

15

3. 請求の範囲第 2 項記載の DNA とターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

4. 請求の範囲第 3 項記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

20

5. プラスミドが pUTA-ACT1-ORF2S である請求の範囲第 4 項記載のプラスミド。

6. 以下の (a) ~ (d) いずれかの DNA からなる GAP 3 遺伝子プロモーター。

25

(a) 配列番号 10 で示される DNA。

(b) 配列番号 10 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(c) 配列番号 10 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、

置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

(d) 配列番号10で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来のDNA。

5 7. 請求の範囲第6項記載のGAP3遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなるDNA。

8. 請求の範囲第7項記載のDNAとターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

10

9. 請求の範囲第8項記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

10. プラスミドがpUTA-GAP3-ORF2Sである請求の範囲第9項記載のプラスミド。

15

11. 以下の(a)～(d)いずれかのDNAからなるPMA1遺伝子プロモーター。

(a) 配列番号11で示されるDNA。

20 (b) 配列番号11で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

(c) 配列番号11で示される塩基配列において、少なくとも1個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

(d) 配列番号11で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来のDNA。

25

12. 請求の範囲第11項記載のPMA1遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなるDNA。

13. 請求の範囲第12項記載のDNAとターミネーターからなる遺伝子発現

ユニット。

14. 請求の範囲第13項記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

5 15. プラスミドがpUTA-PMA1-ORF2Sである請求の範囲第14項記載のプラスミド。

16. 以下の(a)～(d)いずれかのDNAからなるTEF1遺伝子プロモーター。

10 (a) 配列番号12で示されるDNA。

(b) 配列番号12で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

(c) 配列番号12で示される塩基配列において、少なくとも1個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

15 (d) 配列番号12で示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する、キャンディダ属酵母由来のDNA。

17. 請求の範囲第16項記載のTEF1遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなるDNA。

20

18. 請求の範囲第17項記載のDNAとターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

19. 請求の範囲第18項記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

25

20. プラスミドがpUTA-TEF1-ORF2Sである請求の範囲第19項記載のプラスミド。

21. 宿主細胞に、請求の範囲第2、7、12または17項記載のDNAを導

入した形質転換細胞。

22. 宿主細胞に、請求の範囲第4、5、9、10、14、15、19または20項記載のプラスミドを導入した形質転換細胞。

5

23. 宿主細胞がキャンディダ・マルトーサである請求の範囲第21または22項記載の形質転換細胞。

24. 構造遺伝子が、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合ポリエステルの合成に関与する酵素をコードする、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である請求の範囲第21~23項いずれか1項に記載の形質転換細胞。

10

25. 請求の範囲第24項に記載の形質転換細胞を培養することを特徴とする、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合ポリエステルの生産方法。

15

20

25

1 / 4

図 1

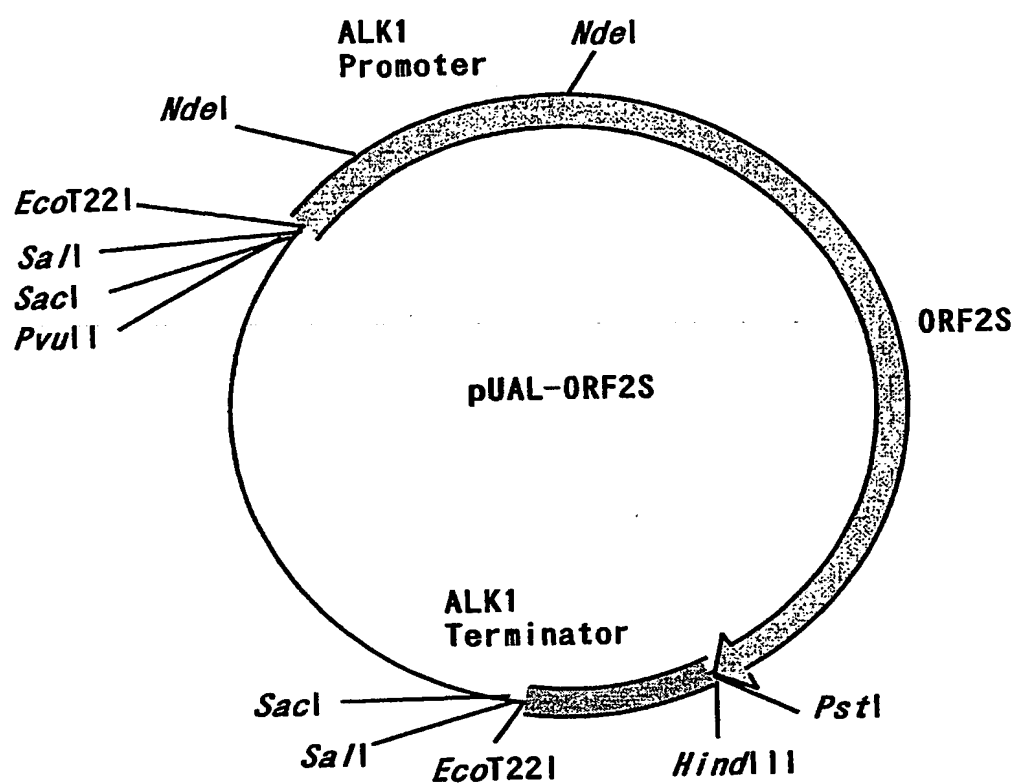
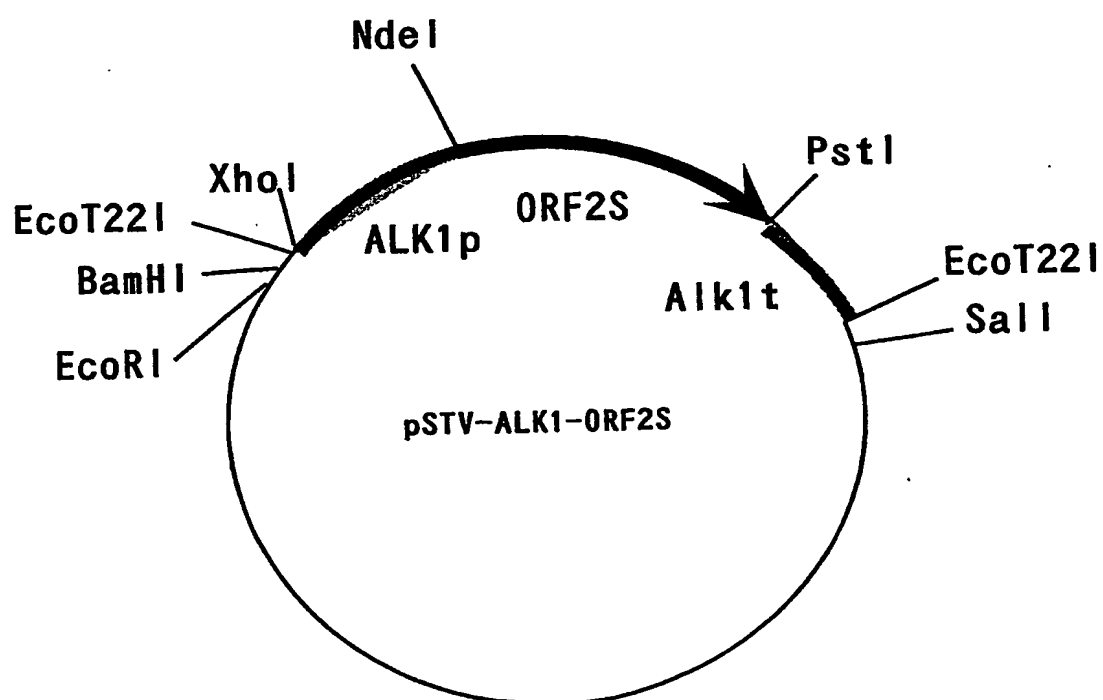


図 2



2 / 4

図 3

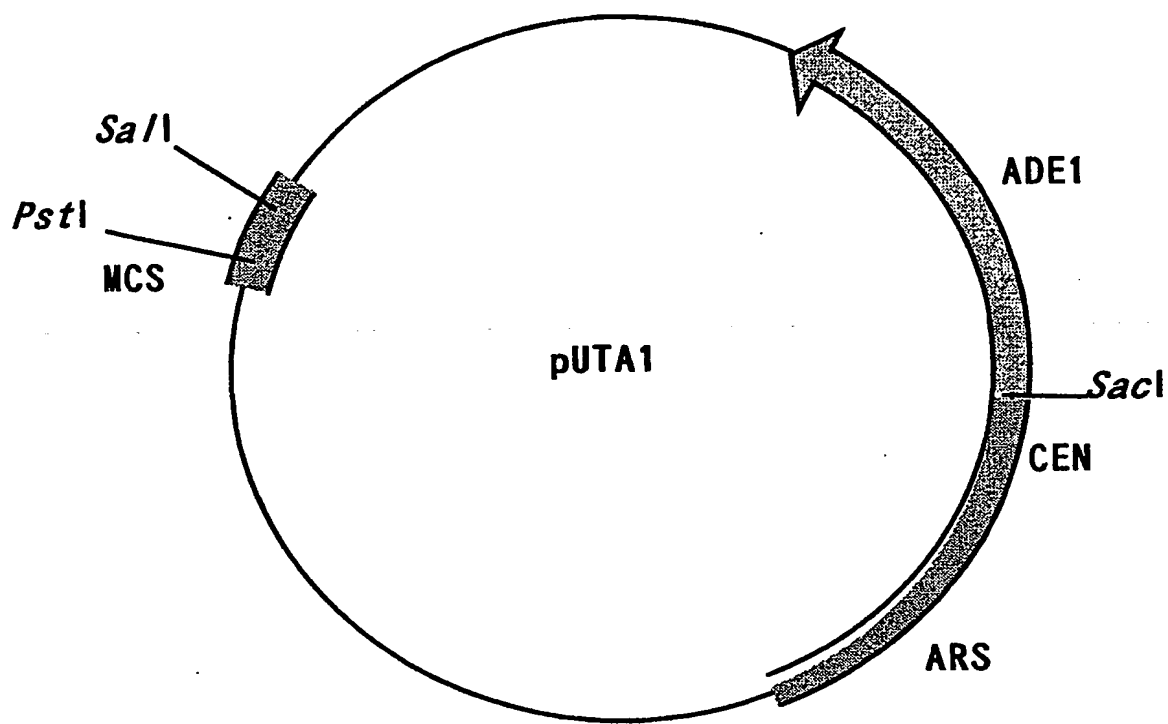


図 4

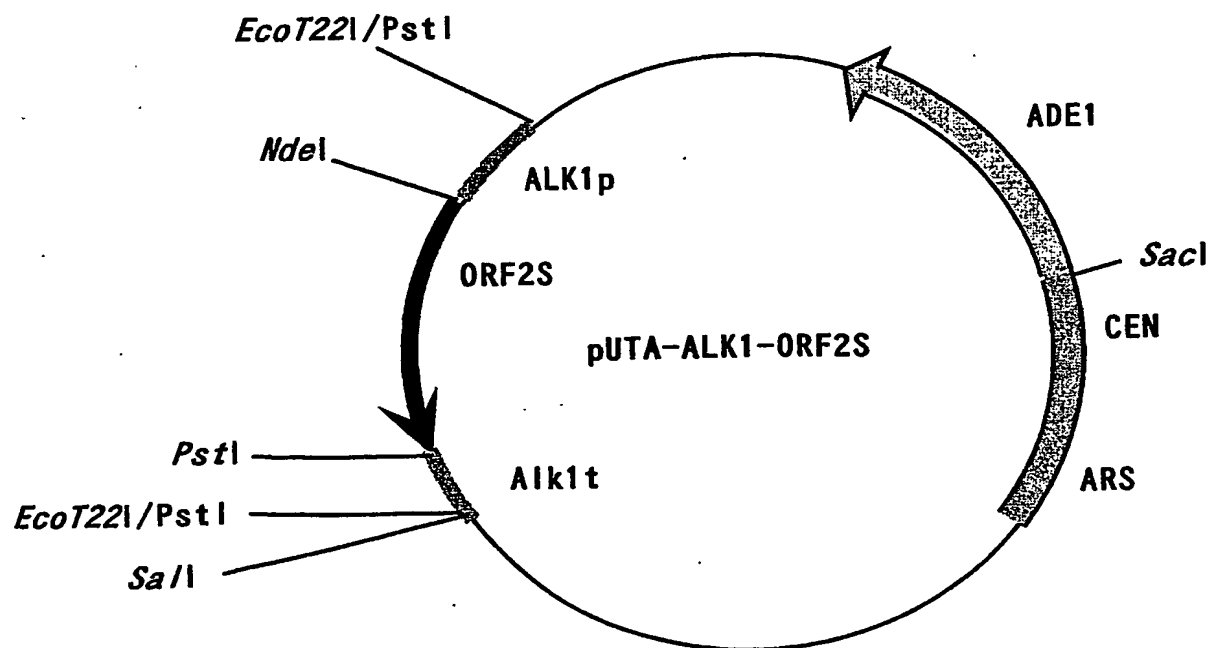


図 5

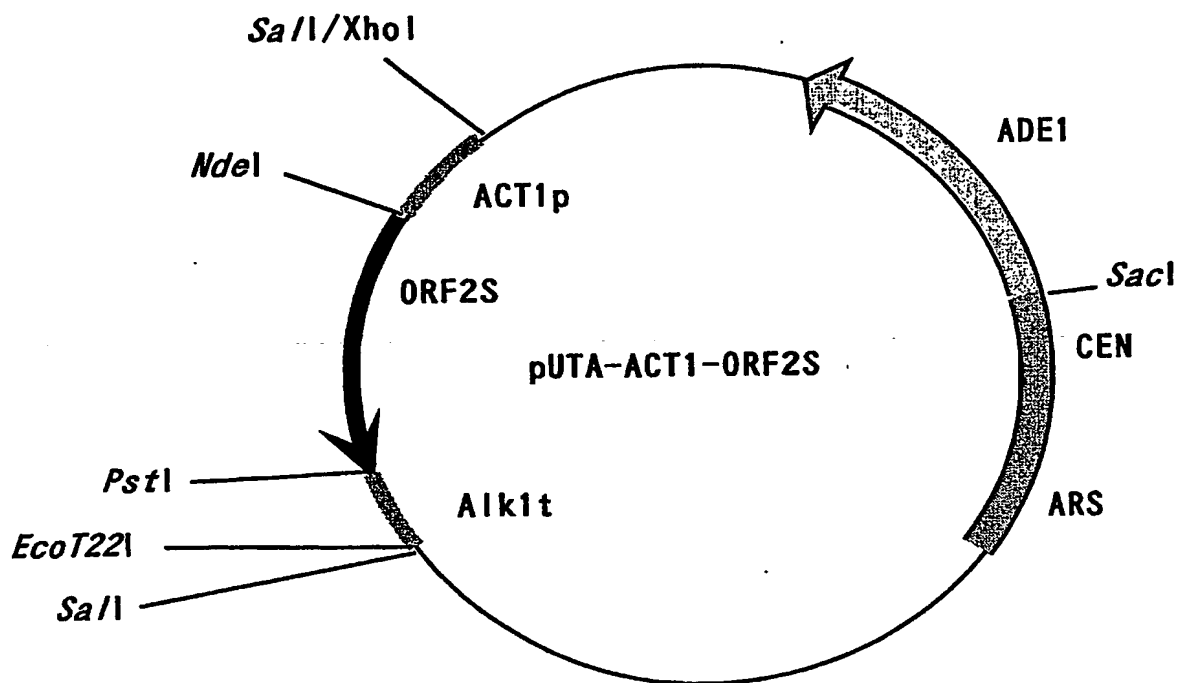


図 6

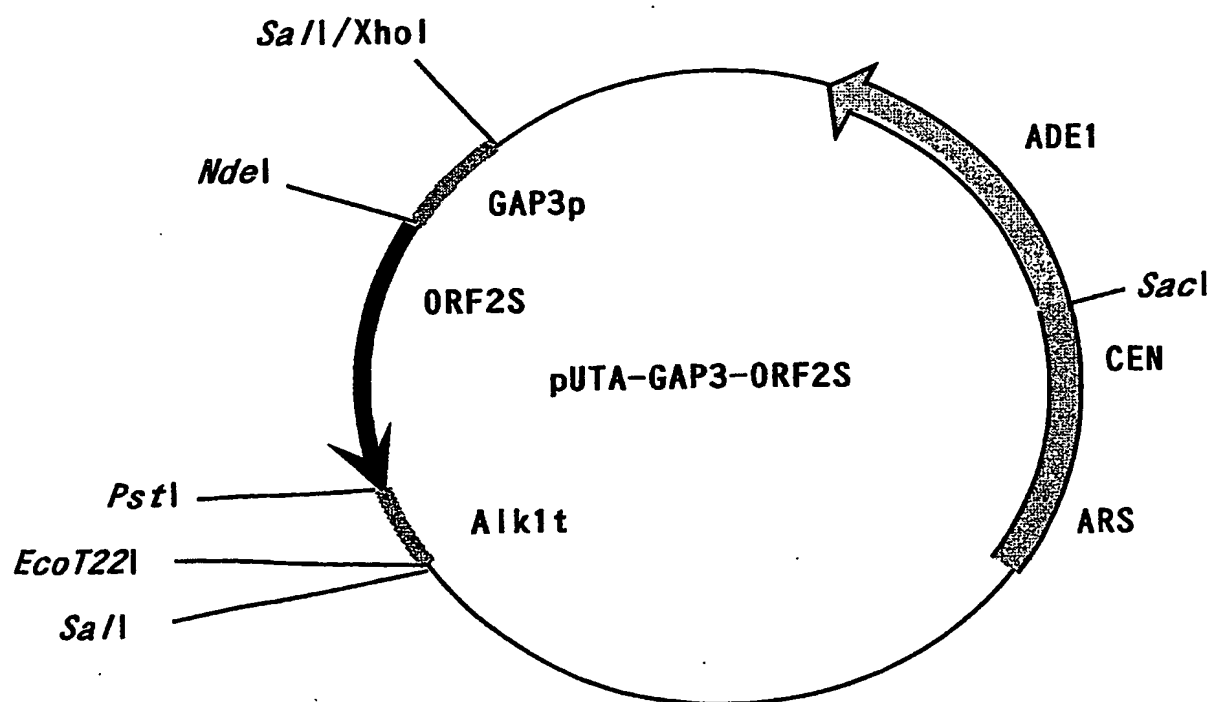


図 7

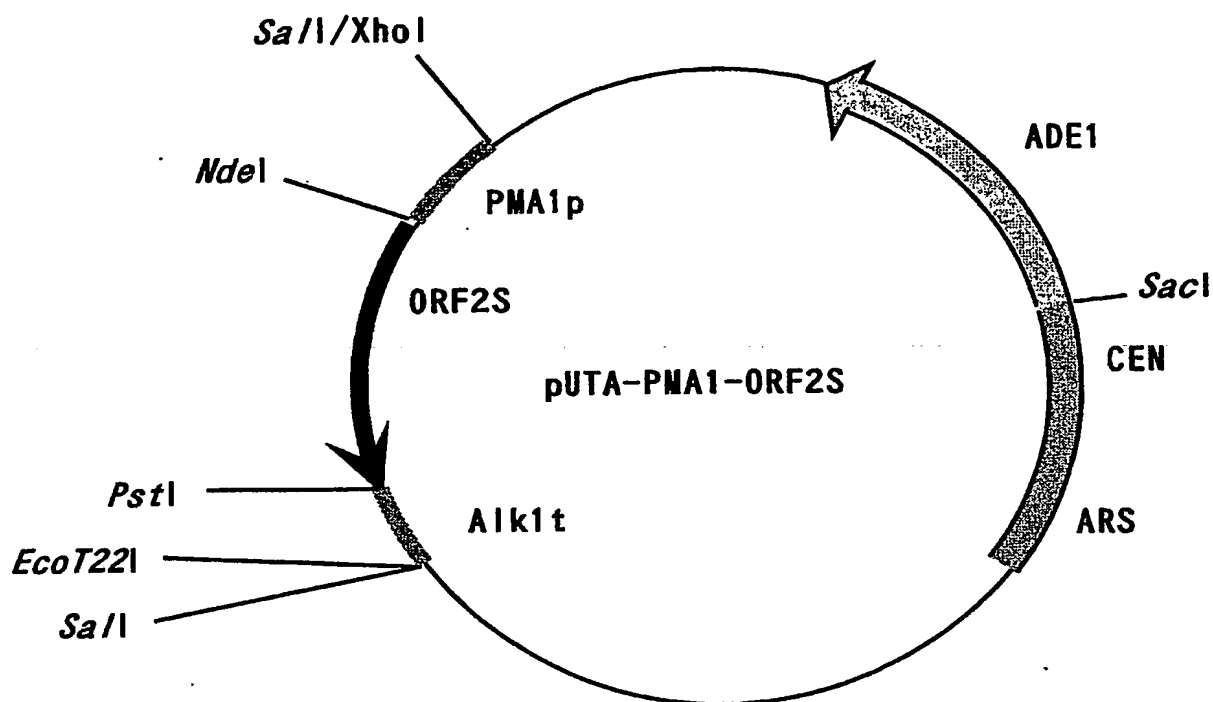
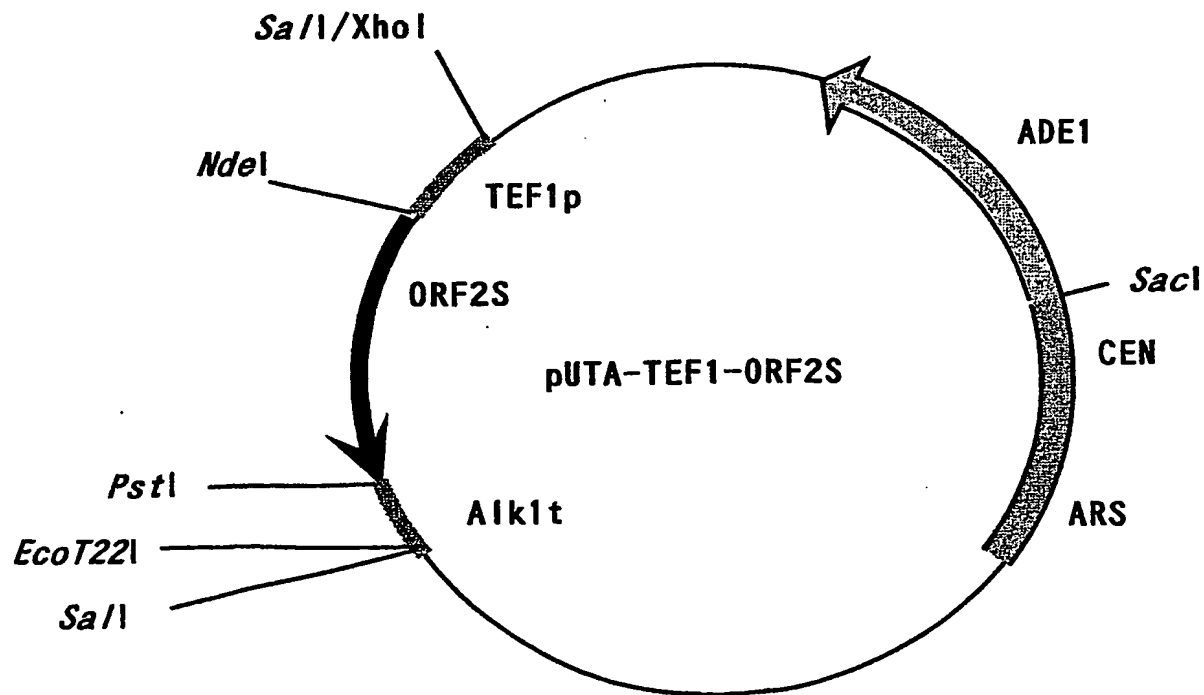


図 8



1 / 2 0

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KANEKA CORPORATION

<120> A new promoter

<130> T747.SBP-7

<150> JP 2002-105240

<151> 2002-4-18

<160> 27

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-ACT1 5'

<400> 1

ccggaattca tggattctgg tatgttcta

29

<210> 2

<211> 29

2 / 2 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-ACT1 3'

<400> 2

ccggaattca agacagcacg aggagcgtc

29

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-GAP3 5'

<400> 3

atgatcagaa ttgctattaa cggtttcggt

30

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-GAP3 3'

3 / 2 0

<400> 4

ttaagccttg gcaacatatt cgatcaagt

29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-PMA1 5'

<400> 5

atgactgata catcatcctc ttcacatcc

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-PMA1 3'

<400> 6

ttaggtttcc ttttcgtgtt gagtagagac

30

4 / 2 0

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-TEF1 5'

<400> 7

atgggtaaag agaagtctca cattaacgtt

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-TEF1 3'

<400> 8

ttattttctta gcagcctttt gagcagcctt

30

<210> 9

<211> 1300

<212> DNA

5 / 2 0

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-ACT1 Promoter

<400> 9

gatctcggct gtgaatcgca atttgccatg acacctctcg ctatttccga attacataag 60
accatcagtg aaagattgga gagaaaaaaa tgtgaacaga atagtcggag tttatattaa 120
attcatcgtc caaaaaaacc tgaatatcat tggctctgcg gtttattaaa aagtgtaccg 180
ccgacttatc cgaacaatta aacgtaacat gactgcaaaa aaaaaccatg aagaaaacat 240
ttacaaaata tttgtaatat cgtcgaagat aataaaccat accagaogga aagttggatg 300
aaattgttgc aaaaataatt atgctactcg ttctcacgtt taaatataca cgtagatcaa 360
accagcaaac ttctataaat tgccatcgat ccaccaaaca tcgtcaaaaa caattttgta 420
actttattgc ctctcatagc tttaaatttc aaaatcaata aatattaatc aaccgtgtaa 480
caaaaaaaaa aaactgagat agtgcacagc ccaaaaaggt ttagtgattg cctccaaaca 540
tacataatag gttatTTTTT tCGTTgaacg catttcttgc togetcaccg aatttctgcc 600
aacgaaacaa attttatata ttcatTTTTT ttctctttca tgtaattttt tctttctttc 660
tgctttttct tttttttttc ttttccttcc caatcccccc ctacattaat atattaatta 720
tcatttaaaa tggacggtgg tatgtttaaa ctatttcatt gacttgattg atcgattgat 780
tgattggttg atttcttcaa agcacggact tttttctttt ctccattatt tgatttttag 840
attttgggtg atttttttgt tttttttggg gagtgactga tctaattctca attcaggatt 900
atgggacgaa gaagaatcga gagatggaat ctagatatat caatttcaat ttttattggt 960
ttgatctcga gagtatTTTt ggaaagattt gattgaacaa cttttttttt cattggcctg 1020
gatcaattcc gtccataaaa gaaagagagc ttacactga tcgattcatt catatttttt 1080
aactggagt ttcttcaaaa atcattggat tctacccaat ggcaatccta catcttaaaa 1140
atcatcattt attacgagtt tattggataa tggtcacttt aaattcttgg tatcttgaat 1200
ttgttttttt tttttttttt tttcagaaat ttgtaccccc ttttaaaaat gttcagaatt 1260
tttttttttt tttcgtcaaa cccacacaca cacatttttc 1300

6 / 2 0

<210> 10

<211> 3000

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-GAP3 Promoter

<400> 10

ctgcagggtgg gatcttcaga ctgtttaata tttcttcaat atgatgggtc ccataattag 60
aaacccaat actcttaaca atccccttgg acacggcttc ttccatgact ttccaacttt 120
ccaatcgttt ttgtttccca ggtaatggtg aatggatcaa taacaaatcg atatatttca 180
aatcaccaat ttgatccaac atagtagtga tcgcatgtct tgtatttggt gtacccaatt 240
gactattcca tagtttgggtg gtatagaaaa actctgaacg agggatatct ggattatcgt 300
gaaggaattt cgttatccct tctgccactt cttcttcggt gccgtacaaa actgcggtat 360
caaaatgtcg atatccgact ttacaggctt cgtagacaat gctggccggt ttattttcttg 420
gaatgtcgta acagcctaaa ccgattgaag ggatgctata tccggaattg agtttgatta 480
atcgaaatga catgattgtg ttgagtatat tgaaagcaat aattaatata aaaaaagag 540
gaacgaaaaa aaagagagat gttgaagtgg ttgggttatg taagtacgta tttattcact 600
gattattaat tgctatctta ataatatatt tttccctccc atttttactt tttttggata 660
tcttgtttga aatgtggggg caaaaaaaaaa aaaaatttac atagccctat tccataaaat 720
ataaatcttt tatgtatatt tgcaacatcg acacaatttg atatttccaa atactccagg 780
tttttttttc tttttcattc acagtctcgg gattaagtgt gaaaccgggg ggaaatcgaa 840
attttttttt ttcagcattg tttatacaca atttcagttt gtccgaatac acccgcacgt 900
gattcccca aacaggcaaa aaaaaaaaaa aatgaatata tagtgagtac gtgtcccgcg 960
gctcaggaac ctcttttttt tttagagggtg gtatgatgtg aagtattttt ttttttcct 1020

7 / 20

ttttcctttt cctttttcat tcacaccacc accatataga atttaacttac gtcaggttat 1080
attctagaca acctttgtgg tttttttttt taaagggaaat ttgagccact atgtccatag 1140
aaaacttttt actgtaacga aaatctatag tctgagataa aggggaaaat ggtaaccacg 1200
tattttttta ttttttttg gattcctata accccgatat ttatgttcgg aattgtagat 1260
atatagatat tccagattac ttggctgtaa tgtaggctat ggaaatgata ctactcatca 1320
atataaacc attgacagta taagatagat aattatactg tgggtggtacc atataaaatt 1380
aatatgttga tcagggtgctt ttggcaacac cacgagcttt gcgcaagttt ttttttttg 1440
ttcttttttg ttttttggtg gttgtttgat gcaaattggat gataatgcc cgggcgcggg 1500
cgtgtgtgac gcaaattcaa tagaaaaaat tcacctggtt aaacctattt tcaactgaaa 1560
atcaatttat ttgccaaaa gaaaaaaaga atatataata acccttgaat gtccaattgg 1620
aattttttt ctctttctaa aatttttctt tctttctttc ttttcttctt cttttcttct 1680
ttacacaatc aattgacttt aaacctcaat taaacaacac ataactttca aacttacttt 1740
ttaacataca aaaaatggct attaaaattg gtattaacgg tttcggtaga atcggtagat 1800
tagtcttgag aattgcttta ggcagaaaag acattgaagt tgttgccgtc aacgatccat 1860
tcattgctgc tgattacgct gcttacatgt tcaaatacga ttccaccac ggtagataca 1920
aagggtgaagt caaatctgaa ggtaacgatt tagtcattga cggtaaagaa atccaagtct 1980
tccaagaaag agaccagct aacattccat ggggtaaaga aggtgttgaa tatgttattg 2040
actccactgg tgttttcacc aagattgaag gtgctcaaaa acacattgat gctggtgcca 2100
aaaaagttat catcactggg tcatctgctg atgctccaat gttcgttggt ggtgttaacg 2160
aagacaaata caccacagac ttgaaaatca tttctaacgc ttctgtacc actaactgtt 2220
tagctccatt agctaaagtt atcaacgata ctttcggaat tgaagaaggt ttgatgacca 2280
ctgtccactc catcactgct acccaaaaga ctgttgacgg tccttccac aaagattgga 2340
gagggtgtag aactgcttcc ggtaacatta tccatcttc tactggtgct gctaaagccg 2400
tcggtaaagt tatcccagaa ttaaacggta aattgactgg tatgtctttg agagttccaa 2460
ccaccgatgt ctccgttggt gacttgactg tcagattatc taaaccaacc acttacgaag 2520
aaatctctga agctatcaag aaagctgctg atgggtccatt gaacggaatc ttgggttaca 2580
ctgaagatgc tgttgtctct actgacttct tgtcttctaa ctactcttct gttttcgatg 2640
ctaaagctgg tatcttggtg tccccaactt tcgtcaaatt gatctcttgg tacgataacg 2700

8 / 2 0

aatacgggta ctctaccaga gttgtcgact tattggaaca cgttgccaaa gtttcgggtt 2760
cctcttaact cagaaacaag ttttagttga cattgtgtct gttttctttt attacatagg 2820
ttgttatatc aatatatgtt tataaatacg tcttgaaaat cttgtttttt ttttttgtaa 2880
attttgtaaa ttttcatctt gtgcgggaca aaggacgagt ggagaaaaaa aaaacgaaac 2940
tttttttttc ttttctccga aattgtaaac aaaaacaaca acaacacctc catgtcggaa 3000

<210> 11

<211> 3173

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-PMA1 Promoter

<400> 11

tctagaattt atattgggtt ctttcttttt ttttagatcg tttattaatt aattagttaa 60
ttaattactt cataacatgt aaattagatt taaccaaaaa aaagaaaagt taaagataat 120
ggctaagtag atgttaaagc caggttcaat tgtttataat actcatcatc atcaatcaat 180
taaattgcaa aaacaaacaa acccgttgaa aaaaggaaag aaaaaaaaaa cacggctggt 240
aataaatctt tcatgtactg gtcaattaat taaccgacgt aataagagat cttgggataa 300
atagtaagaa tatccagcaa tttacgtacg taaatgaaac acaaatgaat gaatgctgaa 360
ctttcatgac ttaattgagt agtttagttg gttggtatat gcgaaattta tttattccga 420
taattattat caataggttg tagcgggaaa tttaaaacca aacaggagat tagaagcggc 480
agaatgaaat aaaaaaaaaa atggccggcg aaaaaaaaaa ggaaaaaaag gaaggaaaaa 540
aaaacgaaaa agggtcgggt aaatctactc acaaatatt ataataatga ttgtttattt 600
atctatggat gtttgatga attaagtcaa gtttgtgta tttcgtatga aagagacata 660
gttagagata gagatagata gacaaataga tttgagagat gaggtggttc agttacatta 720

catttttttt tcttaaaaac taaaaatatt tcttatgtaa ctttccagtt tattatatta 780
ataccaagaa agttatatgt aatatcagtt gatattcaac aattgctggt acaattgtca 840
actctcaact tctaccttcc catttgaata tctctcttcc agtcatatga gttgtattca 900
aaattttttt tatttccggt cggcataatt aattttgtgt cgtgggaata tgcacaattt 960
ataaaacaaa agcaaaatct aaattgaggg aatttctgca gaagagtcaa aaaaaacata 1020
aagtcgtgtc tcggaactca aaaataacat tttccatact aagattaaac gataacattt 1080
aaaaaaatcc acaaatttga ttggtcggaa taaaaataa aaatatccct caccctaaag 1140
aaagaaaatt tttttattta gttgagaaaa ccgaataatt ttgtcctatg aggtaattaa 1200
atatttccat ttgtgttat tgtttattat tttcctaaac cactttatca aaaaaagaaa 1260
aagaaatttt tcttcttttt tggacaaaat taaaaatttt ttacaacctc ttctaaaaaa 1320
gaaaaacaac aacaacagaa aaacgacctc caaaaaaatc ttacaaccaa aaatttaa 1380
ttttaatttt ccaaaggtaa tataaaaagg ataataaatt cccttgatta gatttttttt 1440
tttaacgaat tctttattca ttttctttt ttcccttttt ttttttttcc tttttttaga 1500
tagtcaatcg aagttttact tttattaact ttttttcta cccactaatt cttactttct 1560
tttttttttc attcaaaaat tttttaatag tatttttaaa aatataccat ctacaccccc 1620
caaaaaagaa aaataaaaag gaattcattt ttaataccct aattttttta tattagaatt 1680
atagagagag aaaaagagac agaaaacaaa aacttatcat gagtgctact gatcctacta 1740
atgaaaagat caataaagac atctccgatg atgaagatga agatattgat caattgggtt 1800
tagatttaca atctaattcca ggtgctttag atgacgaaga agaagaagaa gatcaagctt 1860
cttttaagc cgtccctgaa gaattattac aaactgacct aagaactggt ttatctgatg 1920
atgaagttca aaaaagaaga aaaaagtatg gtttgaatca aatggctgaa gaacaagaaa 1980
atttagtcat gaaattcgtc atgtttttcg ttggtccaat tcaattcgtt atggaagccg 2040
ctgctgtttt agctgctggt ttggaagatt gggtcgattt tgggtgttatc tgtgctttat 2100
tggatttgaa tgcttttggt ggtttcatcc aagaatacca agctgggttct attgtcgatg 2160
aattaaaaaa gacttttagct aacgttgctt tagttgttag aaatgggtcaa ttggttgaaa 2220
ttccagccaa tgaagttggt ccaggtgata tcttgcaatt ggaagatggt accgttatcc 2280
caactgatgg tagaattggt tctgaagatt gtttattaca agttgatcaa tctgctatta 2340
ctggtgaatg tttagctggt gacaaaagat ctggtgactc ttgttactct tcttccactg 2400

1 0 / 2 0

ttaaaactgg tgaagctttt atggttggtta ccgctactgg tgacaacact tttgttggtta 2460
gagctgctgc tttagtcaac aaagcttccg ctggtactgg tcatttcact gaagttttga 2520
acggtattgg tactacattg ttggttttcg tcattgttac tttgttggtt gtctggggtg 2580
cttgtttcta cagaactggt agaattgttc caatcttgag atacactttg gctatcacca 2640
ttattggtgt tccagtcggt ttaccagctg tcgttaccac taccatggct gtcggtgctg 2700
cttacttggc taaaaaaciaa gctattgtcc aaaaattgtc tgctattgaa tcttttggtg 2760
gtgtcgaaat tttatgttct gataaaactg gtactttgac caagaataaa ttgtctttac 2820
atgaaccata cactgttgaa ggtgttgaac cagatgactt gatgttgact gcttgtttgg 2880
ctgcttccag aaagaagaag ggtttggatg ctattgataa agctttcttg aaatctttga 2940
ttaactacc aagagctaaa gctgctttac caaaatacaa agttattgaa ttccaacctt 3000
ttgatcctgt ctccaaaaaa gttactgcc ttgttgaatc accagaagg gaaagaatta 3060
tttgtgttaa ggggtgctca ttattcgtct tgaagactgt tgaagatgcc catccaatcc 3120
cagaagatat ccatgaaaac tatcaaaaca ctgttgccga atttgcttct aga 3173

<210> 12

<211> 1675

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-TEF1 Promoter

<400> 12

ctgcagcagc ttctactgct gccgctccaa cattaggtgc tgaatatact agcgggtactg 60
gtaaattagt tgggtgtggtt acattgactg atattttggg attattttgcc acatcaaaag 120
gtagaagaac tgatccacaa gctgcaagaa accaaagaag aagaagttcc acttccacta 180
cgagatcatc tgttgatagt gcattaaacg ctgaaggtgt gattaatcct tctgccacca 240

1 1 / 2 0

ccaccaccga tgccattcct ggtaataaca attctagtcg tagagaaagt gttgatgctt 300
caagtgatgt tttcagaaaa tcatttacta aacccaaga aaatgtattt tccaaagagt 360
aagggttcct tctttcataa caaaaaaaga aaaacaatca ccgatttatt tatttatttg 420
caatgctatt tataatatat tttgtagata aaaacaaatg aaaaatcttg ttagctatgt 480
atactactac atatatacta caataaaaac acaccaaagt gaaacgtgtt ttgcacaatt 540
tcgcacgact cagaggcatc gcatttctgt cctttttgta cgtcattgta atttttttta 600
tgttattttt ttacagcaa gcaatccaaa aaaacaaaaa aaaaatgaga gagaaaaaaa 660
tgaggggggt gatttaaaaa gatggtcaaa aatattcgtg acatattaca taatcgatga 720
gtttgatatg gaacgaatat tgatggtttt ggtctgaatt gatatgggtg aagtatttgt 780
tggtgataat tttatcaaca taaactcaat tccgctcaat tgtacaaaat tgaccttctt 840
tcgccttttg ttcaatgcca ttttttccaa taattttttt tttcaaattt tgccatccag 900
cacaaagaaa aaaaaaattt acatgtccga caactcaccg gtgtttctga caacaattga 960
caacaccagt ctgtagacc c aattggtaag tcaatgataa ctactacatc tacctagttg 1020
ttatctttta acttaaaatt agcaaagaaa taataatggt tatcattgaa gatggtttca 1080
caaaattaaa cgaatacgtg tacgttttac caaaaagatt tttttttttc tctttagttt 1140
ttttttcggt gttcttccca tcaactgaaa atttttctcc ctctatataa atcaatocca 1200
tcaacgaaaa ttttttttct tcctttttga atttttttt tctcctttt ttttctcctt 1260
tttttttctc cttttctttc ttcacttaac ttatatitaa tcaatcatgg gtaaagaaaa 1320
aactcacgtt aacgtcgttg ttattggtca cgtcgattct ggtaaatacta ctaccaccgg 1380
tcacttgatc tacaagtgtg gtggtattga caaaagaacc attgaaaaat tcgaaaaaga 1440
agctgctgaa ttaggttaaag gttctttcaa atacgcttgg gtcttgata aattgaaggc 1500
tgaaagagaa agaggtatca ccattgatat cgctttgtgg aaattcgaaa ctccaaaata 1560
ccacgttacc gttattgatg ctccaggtca cagagatttc atcaaaaata tgattactgg 1620
tacttctcaa gctgattgtg ctattttgat tattgctggt ggtactggtg aattc 1675

(210) 13

(211) 1794

1 2 / 2 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ORF2S

<400> 13

atg tct caa cca tct tat ggt cca ttg ttc gaa gct ttg gct cat tac 48
aat gat aaa ttg ttg gct atg gct aaa gct caa acc gaa aga act gct 96
caa gcc ttg ttg caa act aac ttg gat gat ttg ggt caa gtt ttg gaa 144
caa ggt tct caa caa cca tgg caa ttg att caa gct caa atg aat tgg 192
tgg caa gat caa tta aaa ttg atg caa cac act ttg tta aaa tct gct 240
ggt caa cca tct gaa cca gtt att act cca gaa aga tct gat aga aga 288
ttt aaa gct gaa gct tgg tct gaa caa cca att tat gat tac tta aaa 336
caa tcc tat ttg tta act gct aga cat ttg ttg gct tct gtt gat gct 384
ttg gaa ggt gtc cca caa aaa tct aga gaa aga ttg aga ttc ttt act 432
aga caa tac gtc aac gct atg gct cca tct aat ttc ttg gct act aac 480
cca gaa ttg tta aaa ttg act ttg gaa tcc gat ggt caa aat ttg gtt 528
aga ggt ttg gct tta ttg gct gaa gat ttg gaa aga tct gct gat caa 576
tta aac att aga ttg act gat gaa tcc gct ttt gaa tta ggt aga gat 624
ttg gct ttg act cca ggt aga gtt gtt caa aga act gaa tta tat gaa 672
tta att caa tac tct cca act act gaa acc gtt ggt aaa acc cca gtt 720
ttg atc gtt cca cca ttc att aat aaa tat tac att atg gat atg aga 768
cca caa aac tcc ttg gtc gct tgg ttg gtc gct caa ggt caa acc gtt 816
ttc atg att tcc tgg aga aac cca ggt gtt gct caa gct caa att gat 864
tta gat gat tat gtt gtt gat ggt gtc att gct gct ttg gat ggt gtt 912
gaa gcc gct act ggt gaa aga gaa gtt cac ggt att ggt tac tgt att 960
ggt ggt acc gct ttg tct tta gct atg ggt tgg ttg gcc gcc aga aga 1008

1 3 / 2 0

caa aaa caa aga gtt aga act gct act ttg ttt act act ttg ttg gat 1056
ttc tcc caa cca ggt gaa ttg ggt att ttt att cat gaa cca att atc 1104
gcc gcc tta gaa gcc caa aat gaa gct aaa ggt att atg gat ggt aga 1152
caa ttg gcc gtc tcc ttc tct ttg ttg aga gaa aac tct tta tat tgg 1200
aat tac tat att gat tct tac tta aaa ggt caa tct cca gtt gct ttt 1248
gat ttg ttg cac tgg aac tct gat tct act aat gtt gcc ggt aaa act 1296
cat aac tct ttg ttg aga aga tta tat ttg gaa aat caa ttg gtt aaa 1344
ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392
act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta tgg 1440
caa ggt acc tgg caa ggt atg aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488
tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att att aat cca cca gct 1536
gct aac aaa tac ggt ttc tgg cac aat ggt gct gaa gct gaa tct cca 1584
gaa tct tgg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc tgg tgg cca 1632
gaa atg atg ggt ttt att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680
cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728
gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct tgt cca acc gaa gaa gat 1776
gct gct tct aaa ttg taa 1794

<210> 14

<211> 218

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> terminator ALK1t

<400> 14

1 4 / 2 0

Atagatggat ttttcttttt tatgtgtatt tccggttaat aaatgtttta attttttttt 60
taataaaaat atttgtagtt atttatatgc aaaaaaaaa aatattcaaa gcaatcttcc 120
tttctttctt tatctttccc ccatgctaag gtctaaaaca ccacaactta aaacccaact 180
taaccgtata atactaagat caatctccaa agatgcat 218

<210> 15

<211> 1017

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> promoter ALKlp

<400> 15

atgcatgaac aggatttaat cccaagaaaa aagtctatit tctattttca caaggaaact 60
ggaaaaacct ttttgtgttt tgaagtagct ccgtaataac ctgtaaaaa ataaattttg 120
aagatttgac ttgctgatga aaatgctatc agtgtagctc tagacttgat actagactat 180
gatggcaaca catggtggtc aacgtgcaag acatcaccca atgagaagac tgctaaccag 240
aaaaaaaaagg ggacaaaaga aaaactcgag agaaaaagtc aaattgggtgt aaaattggct 300
atttttggtta ctttcctaata ggggaaatta attgttttaa attccagttt ttccagagtt 360
aagatttcga ccaattatit ttaatccata tgatcttcat cattatcaac ttgtgaaaa 420
taataatcga ggtacgttta atacgagata ttagtctacg gctatgaatg ttggatatac 480
ttcattgacg atcagaagct tgattggtta ttcaggtgca tgtgtggata taaacccaac 540
aaattatcta gcaactgtgc cttccccaca ttggtcaaag aaaccctaaa gcaaattaaa 600
atctggataa ataaatcatt catttcacat tttccgggta gtataagggt ttttaaattt 660
ttttttacag tttagccctt tcaattacca aatacggtaa caatgtgctt tgtaacatgc 720
aggggatttt ctccgttgct gttttctcca catgctttta atgtgtaata aattaaaaaa 780

1 5 / 2 0

attacaaaga aaaaccggca tataagcatc ggagtttaca ttgttaacta actgcaaaat 840
ggcgatgttt caaatcaaca aaattttaaaa aaaccccaaa aaaaaagtat catataaatt 900
aaactcaaaa tccttttgat tgcataaaat ttttaaattct cttctttttt ttctttttta 960
ctttcttattc tattctattc tttttttata tatctaattc atttataaca tctggtc 1017

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1p 5'

<400> 16

tttttcagct ggagctcgtc gacatgcatg aacaggattt aatccc

46

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1p 3'

<400> 17

ccggaattcc atatgcagat gttataaatg aattagata

39

1 6 / 2 0

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1t 5'

<400> 18

cggaagctta tagatggatt tttctttttt at

32

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1t 3'

<400> 19

tttttgatatc gagctcgtcg acatgcatct ttggagattg atctt

45

<210> 20

<211> 47

1 7 / 2 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-ACT1p 5'

<400> 20

cgcggatccg aattcgtcga catgcatgga tctcggctgt gaatcgc

47

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-ACT1p 3'

<400> 21

gcgggatccc atatgtatcc aataaactcg taata

35

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

1 8 / 2 0

<223> PCR Primer for Cm-GAP3p 5'

<400> 22

atggctatta aaattggtat taacggttc ggtag

35

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-GAP3p 3'

<400> 23

agaagcattg gagataatct tcaagtctgg agtgt

35

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-PMA1p 5'

<400> 24

gaatatctct cttccagtca ctcgagttgt attc

34

1 9 / 2 0

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-PMA1p 3'

<400> 25

ctcatatgaa gtttttgttt tctgtctc

28

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-TEF1p 5'

<400> 26

gcgggatacct cgagtaagggttccttcttt cata

34

<210> 27

<211> 38

2 0 / 2 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-TEF1p 3'

<400> 27

ttttctttac ccatatgtga ttaaataataa gttagatg

38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/11, 1/19, C12P7/62// (C12N1/19, C12R1:72)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN),
JSTPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	LOSBERGER C. et al., Sequence of the Candida albicans gene encoding actin. Nucleic Acids Res., 1989, Nov 25, 17(22), page 9488	1-4, 21-23 5, 24, 25 6-20
X Y A	GIL-NAVARRO I. et al., The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Candida albicans is a surface antigen. J.Bacteriol., 1997 August, 179(16), p.4992-9	6-9, 21-23 10, 24, 25 1-5, 11-20
X Y A	MONK B.C. et al., Cloning and characterization of the plasma membrane H(+)-ATPase from Candida albicans. J.Bacteriol., 1991 November, 173(21), p.6826-36	11-14, 21-23 15, 24, 25 1-10, 16-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
02 June, 2003 (03.06.03)

Date of mailing of the international search report
17 June, 2003 (17.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04426

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	SUNDSTORM P. et al., Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast <i>Candida albicans</i> . J.Bacteriol, 1990 April, 172(4), p.2036-45	16-19, 21-23 20, 24, 25 1-15
Y A	FUKUI T. et al., Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of <i>Aeromonas caviae</i> establishes copolyester biosynthesis pathway in <i>Escherichia coli</i> . FEMS Microbiol Lett, 01 January, 1999 (01.01.99), 170(1), pages 69 to 75	5, 10, 15, 20, 24, 25 1-4, 6-9, 11-14, 16-19, 21-23
A	MUTOH E. et al., A gene coding for a ribosomal protein L41 in cycloheximide-resistant ribosomes has a promoter which is upregulated under the growth-inhibitory conditions in yeast, <i>Candida maltosa</i> . Biochem.Biophys.Res.Comm., 19 May, 1999 (19.05.99), 258(3), p.611-5	1-25
A	OHKUMA M. et al., Evidence that the expression of the gene for NADPH-cytochrome P-450 reductase is n-alkane-inducible in <i>Candida maltosa</i> . Biosci.Biotechnol.Biochem., 1995 July, 59(7), p.1328-30	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04426

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The Candida Maltose-origin promoters not restricted to carbon sources as set forth in claims 1 to 5 and 11 to 20 and the Candida Maltose-origin promoters as set forth in claims 6 to 10 are common to each other exclusively in being a Candida Maltose-origin promoter. However, Candida Maltose-origin promoters had been publicly known (Curr Genet, 1994, 25, p.412-417) and thus these groups of inventions are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, there is no special technical matter common to all claims.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl¹ C12N15/11, 1/19, C12P7/62 // (C12N1/19, C12R1:72)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl¹ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

JSTPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	LOSBERGER C et al., Sequence of the Candida albicans gene encoding actin. Nucleic Acids Res, 1989 Nov 25, 17(22), p. 9488	1-4, 21-23 5, 24, 25 6-20
X Y A	GIL-NAVARRO I et al., The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Candida albicans is a surface antigen. J Bacteriol, 1997 Aug, 179(16), p. 4992-9	6-9, 21-23 10, 24, 25 1-5, 11-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 6 . 0 3

国際調査報告の発送日

17.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

印

4 B

9 8 3 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	MONK B C et al., Cloning and characterization of the plasma membrane H(+)-ATPase from <i>Candida albicans</i> . J Bacteriol, 1991 Nov, 173 (21), p. 6826-36	11-14, 21-23 15, 24, 25 1-10, 16-20
X Y A	SUNDSTORM P et al., Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast <i>Candida albicans</i> . J Bacteriol, 1990 Apr, 172 (4), p. 2036-45	16-19, 21-23 20, 24, 25 1-15
Y A	FUKUI T et al., Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of <i>Aeromonas caviae</i> establishes copolyester biosynthesis pathway in <i>Escherichia coli</i> . FEMS Microbiol Lett, 1999 Jan 1, 170 (1), p. 69-75	5, 10, 15, 20, 24, 25 1-4, 6-9, 11-14, 16-19, 21-23
A	MUTOH E et al., A gene coding for a ribosomal protein L41 in cycloheximide-resistant ribosomes has a promoter which is upregulated under the growth-inhibitory conditions in yeast, <i>Candida maltosa</i> . Biochem Biophys Res Commun, 1999 May 19, 258 (3), p. 611-5	1-25
A	OHKUMA M et al., Evidence that the expression of the gene for NADPH-cytochrome P-450 reductase is n-alkane-inducible in <i>Candida maltosa</i> . Biosci Biotechnol Biochem, 1995 Jul, 59 (7), p. 1328-30	1-25

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-5、11-20における炭素源の種類によって制限されないCandida Maltosa由来のプロモーター、と、請求の範囲6-10におけるCandida Maltosa由来のプロモーター、はCandida Maltosa由来のプロモーターである点でのみ共通する。しかし、Candida Maltosa由来のプロモーターは公知 (Curr Genet, 1994, 25, p. 412-417) であるから、両発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲全てに共通の特別な技術的事項はない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。